

DETECTION OF ENTEROVIRUS AND DISCRIMINATION OF THE SAME

Patent number:	JP6311900
Publication date:	1994-11-08
Inventor:	NARISAWA TADASHI; ISHIKO HIROAKI; SAKAE KENJI; ISHIHARA YUUICHI; TAKEDA NAOKAZU; MIYAMURA KIKUKO; INOUE SAKAE
Applicant:	MITSUBISHI YUKA B C L KK; INOUE SAKAE
Classification:	
International:	C12Q1/70; C12N15/41
- european:	
Application number:	JP19930102254 19930428
Priority number(s):	JP19930102254 19930428

Abstract of JP6311900

PURPOSE: To detect Picornaviridae such as Enterovirus, etc., by amplifying a Specific region of Enterovirus and detecting amplified gene DNA. **CONSTITUTION:** An oligonucleotide (e.g. CTACTTTGGGTGTCCGTGTT) having complementarity to a common type part in the upstream of a gene region coding a part of 5'-non-translated region of Enterovirus, a part of VP4 and VP2 proteins, and an oligonucleotide (e.g. TGGTGGTGGAAAGTTGCCTGA) having complementarity to a common type part in the downstream are subjected to be primers of the PCR method. The amplified gene DNA is detected by polyacrylamide gel electrophoresis, etc.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-311900

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/70		7823-4B		
// C 1 2 N 15/41	Z N A	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平5-102254

(22)出願日 平成5年(1993)4月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月28日～
10月30日、日本ウイルス学会主催の「第40回日本ウイル
ス学会総会」にて文書をもって発表

(71)出願人 591122956

株式会社三菱油化ビーシーエル
東京都板橋区志村3-30-1

(71)出願人 593083538

井上 栄
東京都新宿区戸山1-23-1 国立予防衛
生研究所内

(72)発明者 成澤 忠

東京都板橋区志村3-30-1 株式会社三
菱油化ビーシーエル内

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンテロウイルスの検出および識別方法

(57)【要約】

【構成】 (i) エンテロウイルスの5'-非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、エンテロウイルスの5'-非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、(i i) 該増幅遺伝子DNAを検出することを特徴とするエンテロウイルスの検出法。

【効果】 本発明の方法によれば、高い精度で簡便にエンテロウイルスの検出および血清型の識別が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、

(ii) 該増幅遺伝子DNAを検出することを特徴とするエンテロウイルスの検出法。

【請求項2】 (i) 血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、該増

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

で示される塩基配列を有し、下流の型共通部分に相補性

TGGTGGTGGGAAGTTGCCTGA (2)

で示される配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1又は2のエンテロウイルスの検出または識別方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、エンテロウイルスを高感度に検出し、血清型を識別する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) に属するエンテロウイルス (Enterovirus) はおよそ70種類の血清型、同じくピコルナウイルス科に属するライノウイルス (Rhinovirus) はおよそ100種類の血清型に分類されており、多彩な感染症を示し、臨床症状から原因となるウイルスを推定することは困難である。そのため、病原体を確定するにはウイルスの分離同定が必要となる。しかし、現在のエンテロウイルス分離同定法は、培養法を用いてウイルスを分離し、同定のためには更に中和試験が必要になる。そしてこれらウイルスの分離培養には2~4週間が必要である。さらに標準株の中和抗血清を使用した中和試験は血清型鑑別不可能な分離株が頻繁に出現する。これはエンテロウイルスの遺伝子が自然界では極めて高速で変異をするためと考えられており、これらの解決には常に新鮮分離株を中和する抗血清の作製が必要となる。感染症の病原体の直接検出法として、クラミジア (Chlamydia) 等ではDNAプローブを用いて短時間に検出する方法が確立されている。しかし、その検出感度は低く、エンテロウイルスではプローブ法に必要なウイルス量が患者検体から得られず、更に

幅遺伝子DNAをマイクロプレートに固相化し、

(ii) 血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つV p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅および標識して血清型識別用DNAプローブとし、

(iii) 該DNAプローブを上記 (i) のDNA固相化マイクロプレートに加えて、峻厳条件下でハイブリダイゼーションさせ、結合プローブの種類を解析することを特徴とするエンテロウイルスの血清型識別方法。

【請求項3】 (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、V p 4とV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドが次の配列 (1)

を有するオリゴヌクレオチドが次の配列 (2)

既述のようにエンテロウイルスの遺伝子が極めて高速に変異をするため、標準株のオリゴプローブでは同定の困難が予想される。高感度、特異的にDNAを増幅するポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 [Polymerase Chain Reaction 法、以下これを「PCR法」と略記する; Saikiら, Science, 230巻, p1350-1354, 1985年参照] が開発されてから、5' -非翻訳領域の塩基配列に相補的なプライマーを用いたPCR法や、5' -非翻訳領域内、V p 4とV p 2蛋白をコードする遺伝子領域の塩基配列に相補性を有するプライマーを用いたPCR法で、エンテロウイルスが検出されている [Rotbart, H., 5. J. Clinical microbiology., 28 438-442(1990); Olive, D., M., 5 J. general Virology., 71, 2141-2147(1990)]。しかしながら、これらの方法は、エンテロウイルスの血清型を識別することができず、従ってより高い精度でエンテロウイルスを検出し、かつ血清型の鑑別が可能な方法が求められている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、エンテロウイルスやライノウイルス等のピコルナウイルスを高い精度で検出できるとともに、高い精度でエンテロウイルスの血清型を鑑別することができる方法の提供を目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を有する、V p 4およびV p 2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を含む領域を増

幅し、この増幅遺伝子DNAを検出することによりエンテロウイルス等のピコルナウイルスの高感度な検出が可能であること、さらにこの増幅遺伝子DNAを、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株を用いて前記と同一の領域を増幅および標識して作製したDNAプローブと峻厳条件下で結合させ、結合標識DNAを検出し、結合したプローブの種類を解析することにより、エンテロウイルスの高精度な血清型の識別が可能なることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0005】かくして、本発明によれば、

1. (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、
(ii) 該増幅遺伝子DNAを検出することを特徴とするエンテロウイルスの検出法、
2. (i) 血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライ

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

で示される塩基配列を有し、下流の型共通部分に相補性

TGGTGGTGAAGTTGCCTGA (2)

で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、上記1又は2のエンテロウイルスの検出または識別方法が提供される。

【0006】以下本発明のエンテロウイルスの検出および識別方法について更に詳細に説明する。本明細書において、「ピコルナウイルス」とは、エンベロープのないエーテル耐性の正二十面体対称の粒子で、直径20~30nmであり、中心に1本鎖RNAを持ち、このRNAの分子量は約 2.5×10^6 であり、感染性を有し、かつmRNAの機能を有するウイルス粒子を意味するものである。また「エンテロウイルス」とは、上記ピコルナウイルス科に属し、かつpH3.0で安定であり、CsCl中での浮上密度が $1.32 \sim 1.35 \text{ g/cm}^3$ であるウイルス粒子を意味し、このエンテロウイルス属にはコクサッキーA群ウイルス、コクサッキーB群ウイルス、エコーウイルス、エンテロウイルス、ポリオウイルス等が含まれる。さらに「ライノウイルス」とは、上記ピコルナウイルス科に属し、かつpH3.0で不安定であり、CsCl中での浮上密度が $1.38 \sim 1.40 \text{ g/cm}^2$ であるウイルス粒子を意味するものである。本発明の一つの特徴は、血清型が未知のエンテロウイルス分離株由来の遺伝子の一部を増殖し、同一領域を増幅および標識した血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の遺伝子より作製したDNAプローブと峻厳条件下のハイブリダイ

マーとして用い、血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅し、該増幅遺伝子DNAをマイクロプレートに固相化し、(ii) 血清型が既知の流行エンテロウイルスの分離株の5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5' -非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域を増幅および標識して血清型識別用DNAプローブとし、(iii) DNAプローブを上記

(i) のDNA固相化マイクロプレートに加えて、峻厳条件下でハイブリダイゼーションさせ、結合プローブの種類を解析することを特徴とするエンテロウイルスの血清型識別方法、

3. (i) エンテロウイルスの5' -非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドが、次の配列(1)

を有するオリゴヌクレオチドが、次の配列

ゼーションで結合させ、結合したプローブの種類を解析することにより、エンテロウイルスを検出すると共に、このエンテロウイルスの血清型を識別することにある。このような方法により、エンテロウイルスを高い精度で検出することができると共に、エンテロウイルスの血清型を識別することが可能となる。

【0007】エンテロウイルスは、血清型がおよそ70種あり、また各血清型間が近縁なため、通常のハイブリダイゼーション条件では血清型の識別が困難であり、血清型の識別に際しては、本発明で用いる峻厳条件下でのハイブリダイゼーションを用いるのが好ましい。ここで、峻厳条件下でのハイブリダイゼーションとは、ホルムアミドの存在下でのハイブリダイゼーションを意味するものである。このハイブリダイゼーション条件におけるホルムアミドの存在量は、通常20~70%、特に40~60%の範囲内が好ましく、反応温度は40~70℃、特に40~60℃の範囲内が好ましい。反応時間には特に制限はないが、通常1~24時間の範囲内が適当である。上記峻厳条件下でのハイブリダイゼーションにおいては、同一血清型内においても標準株と分離株(ポリオウイルスの場合はワクチン株と分解株)が区別されてしまい、分離株の血清型の識別が不可能であるが、血清型識別用DNAプローブ作成用のエンテロウイルス遺伝子DNA源として、血清型が既知の流行エンテロウイ

ルス分離株（すなわち過去10年以内に流行し分離されたエンテロウイルス株）を用いて作成された血清型識別用DNAプローブを用いて、上記峻厳条件下でハイブリダイゼーションを行い、結合パターンを解析することにより、各エンテロウイルスの検出および血清型の識別が可能となる。

【0008】エンテロウイルスの血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域、すなわち「エンテロウイルスの5′-非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域」の増幅は次のとおり行うことができる。まず、診察時に採取した髄液等の臨床検体、臨床検体からの分離培養株、継代培養されている血清型が既知のエンテロウイルス標準株等から常法によりRNAを抽出し、この抽出RNAを逆転写酵素を用いてcDNAを作製する。このcDNAに血清型特異的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、すなわち「エンテロウイルス分離株の5′-非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド」をプライマーとして加えて、エンテロウイルスの5′-非翻訳領域、Vp4とVp2をコードする遺伝子領域を含む長さが約650塩基の遺伝子DNA領域を増幅する。遺伝子の増幅は、通常用いられるPCR法【この

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド

TGGTGGTGAAGTTGCCTGA (2)

で示される塩基配列を有するプライマーを用いるのがより好ましい。上述したプライマーの化学合成は、それ自体既知の通常用いられる核酸合成機、例えばアプライド・バイオシステム社製、モデル381-A DNA合成機等を用いる固相合成法により容易に行うことができる。上記の如くしてPCR法により増幅したエンテロウイルスの血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域DNAは、通常用いられるポリアクリルアミドゲル電気泳動、アガロースゲル電気泳動等により分離し、バンドとして検出することができ、これによりエンテロウイルス由来の遺伝子DNAを確認することができる。なお電気泳動後のDNAバンドの検出は、エチジウム・ブロマイドで染色し、紫外線照射により容易に行うことができる。

【0011】上記に詳述した方法によって得られる「血清型が未知のエンテロウイルス分離株の5′-非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域」のDNAを常法により変性させ、マイクロプレート上に固定化してサンプルDNAとする（以下これを「固相化DNA」ということがある）。一方、上記と同様の方法で「血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株の5′-非翻訳領域の一部とエンテロウイルスの血清型に特異的な塩基配列を持つVp4およびVp2蛋白

PCR法の詳細については、特開昭61-274697号公報、特開昭62-281号公報、SakaiらScience 239巻、p487-491参照）により容易に行うことができる。

【0009】エンテロウイルスの血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域の増幅に際して、プライマーとして用いることができるオリゴヌクレオチドとしては、血清型特異的塩基配列を含む遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド、すなわち「エンテロウイルスの5′-非翻訳領域の一部、Vp4とVp2蛋白の一部をコードする遺伝子領域の上流の型共通部分および下流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチド」を同時に用いるのであれば、いかなるオリゴヌクレオチドであってもよい。それらの中で、好ましくは既知の血清型特異的塩基配列データをもとに、エンテロウイルスに特異的かつ種間で共通性の高い塩基配列を5′-非翻訳領域（上流の型共通部分）とVp2領域（下流の型共通部分）に設定し、その塩基配列に基づいて化学合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるのが適当である。

【0010】化学合成したプライマー、すなわちエンテロウイルス特異的遺伝子領域の上流の型共通部分に相補性を有するオリゴヌクレオチドとしては、下記配列

(1)

が下記配列(2)

の一部をコードする遺伝子領域」のDNAを増幅および標識して血清型識別用DNAプローブとすることができる。この血清型識別用DNAプローブの標識は、例えば、DNA増幅反応に用いるdTTPの一部をビオチン dUTPに変更して用いて、DNA増幅を行うことにより容易に実施できる。

【0012】かくして得られる各種の血清型識別用DNAプローブを変性させた後、上記固相化DNA（サンプルDNA）に加えて、前記峻厳条件下でハイブリダイゼーションさせ、固相化DNAへ結合した血清型識別用DNAプローブの種類および量を、酵素標識アビジン等を用いて検出することにより、固相化DNA（サンプルDNA）の調製に用いたエンテロウイルスの血清型を識別することができる。

【0013】

【実施例】以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1 ピコルナウイルス標準株の検出及び血清型の識別

(A) 使用微生物

国立予防衛生研究所において継代培養されている下記31種類の血清型ピコルナウイルス標準株を用いて実験を行った。これらのピコルナウイルスは、いずれも特異抗

血清を用いた中和試験で血清型が同定されている標準株である。

【0014】

【表1】

株名 (血清型)		略号
コクサッキーA群ウイルス	2型	A 2
〃	3〃	A 3
〃	4〃	A 4
〃	8〃	A 8
〃	9〃	A 9
コクサッキーB群ウイルス	1型	B 1
〃	2〃	B 2
〃	3〃	B 3
〃	4〃	B 4
〃	5〃	B 5
〃	6〃	B 6
エコーウイルス	3型	E 3
〃	4〃	E 4
〃	5〃	E 5
〃	6〃	E 6
〃	9〃	E 9
〃	11〃	E 11
〃	14〃	E 14
〃	16〃	E 16
〃	18〃	E 18
〃	19〃	E 19
〃	24〃	E 24
〃	25〃	E 25
〃	27〃	E 27
〃	30〃	E 30
エンテロウイルス	71型	E 71
ポリオウイルス	1型	P V 1
〃	2〃	P V 2
〃	3〃	P V 3
ライノウイルス	3型	R H 3
〃	7〃	R H 7

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT (1)

TGGTGGTGGGAAGTTGCCTGA (2)

の塩基配列で示される20塩基のプライマーを、ホスホアミダイト (Phosphoramidite)法によりアプライド・バイオシステム社製、モデル381-A DNA合成機を用いて合成し、OPC_{TM}カートリッジを用いて精製し、PCRのプライマーとして使用した。

【0017】(E) 固相化DNA調製用遺伝子 (サンプルDNA) の増幅 (PCR)

反応液として、10_x 反応用緩衝液 (Reaction Buffer) 10 μ l、デオキシヌクレオチド3-リン酸混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ;各1.25mM含有) 16 μ l、上記合成プライマー (1) (50 μ M) 2.0 μ l、上記合成プライマー (2) (50 μ M) 2.0 μ l、前記

(C) 項で合成したピコルナウイルスcDNA 100ng~1 μ g、およびTaqポリメラーゼ (宝酒造製) 1 μ l (5Unit) に蒸留水を加え、計100 μ lとしたものを調製した。1サイクルは、塩基酸の変性工程を95

【0015】(B) RNAの抽出

上記各ウイルス液を15%シュクロースによる超遠心操作により沈殿させた後、その沈殿物を Tris-EDTAにて回収し、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿を行った。

(C) cDNAの合成

前記 (B) 項で得た各RNAを鋳型としてリバーストランスクリプターゼ (Bethesda Research Laboratories)を用いて、各ウイルスに由来するcDNAを合成した。

【0016】(D) PCR用プライマーの合成

前記 (A) 項のピコルナウイルスの遺伝子を共通に増幅できるプライマーペアを、血清型特異的な塩基配列を持つVp4及びVp2蛋白をコードする遺伝子領域の塩基配列をもとに、5'-非翻訳領域とVp2領域の各々に相補性を有する下記配列 (1) および配列 (2)、

℃30秒、アニーリング工程を45℃1分、塩基鎖伸長工程を72℃2分に設定し、アンプリフィケーション・システム (amplification system ;シータス社) を用いて、標的DNAを35サイクル増幅した。この増幅遺伝子を固相化用サンプルDNAとして用いた。

【0018】(F) 血清型識別用DNAプローブ調製用遺伝子の増幅 (PCR)

反応液として10_x 反応用緩衝液 (Reaction Buffer) 10 μ l、デオキシヌクレオチド3-リン酸混合液 (dATP, dCTP, dGTP ;各1.25mM dTTP ;0.94mM) 16 μ l、Biotin-11-dUTP (Enzo Diagnostics) 16.7 μ l、上記合成プライマー (1) (50 μ M) 2.0 μ l、上記合成プライマー (2) (50 μ M) 2.0 μ l、前記

(C) 項で合成したピコルナウイルスcDNA100ng~1 μ g およびTaqポリメラーゼ (宝酒造) 1 μ l

(5Unit) に蒸留水を加え、計100 μ lとしたものを

調製した。1 サイクルは、塩基鎖の変性工程を 95℃ 30 秒、アニーリング工程を 45℃ 1 分、塩基鎖伸長工程を 72℃ 2 分に設定し、アンプリフィケーション システム（シータス社）を用いて標的 DNA を 35 サイクル増幅した。このピオチンで標識された遺伝子 DNA を血清型識別用 DNA プローブとして用いた。

【0019】 (G) ゲル電気泳動法による増幅遺伝子 DNA の確認

3.0% のアガロースゲルにエチジウムブロマイドを 0.5 µg/ml 加え、上記 (E) および (F) 項で増幅した DNA の電気泳動を行った。泳動後 254 nm の紫外線を照射し、エチジウムブロマイドの発色反応により DNA バンドを検出し、エンテロウイルスの 5' 非翻訳領域の一部と血清型に特異的な塩基配列を持つ VP4 および VP2 蛋白の一部をコードする遺伝子領域に由来する約 650 塩基の標的 DNA バンドを確認した。

(H) 増幅 DNA の精製および濃度測定

前記 (E) および (F) 項で増幅した遺伝子 DNA をフェノール/クロロホルムにて抽出後、エタノールを用いて沈殿させ回収し、濃度を 260 nm の吸光度により算出した。

【0020】 (I) プレートハイブリダイゼーション
マイクロプレート固相法 (Inouye Hondo, J. Clin. Microbiol. 28 : 1469, 1990) の変法により行った。上記

(H) 項で精製したサンプル DNA を熱変性後、50 ng / 100 µl/well を、1.5 M NaCl、10 mM リン酸ナトリウム、10 mM EDTA 存在下でマイクロプレート (NUNC-IMMUNO PLATE MAXISORP F96) に 37℃ 2 時間で固相化した。これを PBS-Tween 20 で 3 回洗浄し未反応サンプル DNA を除去した。ハイブリダイゼーシ

ョンは前記 (H) 項で精製した血清型識別用 DNA プローブを熱変性後、1.25 ng / 100 µl/well を、50 % ホルムアミド、0.75 M NaCl、0.1 % Tween 20、Salmon sperm 50 µg/ml の存在下で前記マイクロプレートに 50℃ 8 時間行った。ハイブリダイゼーション後、マイクロプレートを PBS-Tween 20 で 3 回洗浄し、未反応血清型識別用 DNA プローブを除去した。次にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの 1 : 1,000 希釈液 (1 % BSA、0.1 % Triton X-100、PBS-Tween 20) を滴下、室温 2 時間反応させた。再びマイクロプレートを PBS-Tween 20 で 3 回洗浄後、0.012 % H₂O₂、0.04 % オルトフェニレンジアミン、0.05 / 0.024 M リン酸ナトリウム-クエン酸 (pH 5.0) を 100 µl/well となるように加え、室温で 30 分、遮光状態で反応させ、4N 硫酸 50 µl/well を加え反応を停止させた。反応によって生じたマイクロプレートの着色量を、マイクロプレートリーダー (パイオラッド社製) を用いて波長 492 nm で吸光度 (OD) を測定した。各マイクロプレートの吸光度から血清型識別用 DNA プローブの結合率 (%) を次のとおり求めた。

結合率 (%) = (互に異なる血清型ウイルス由来の固相化 DNA と識別用 DNA プローブとのハイブリダイゼーションの OD 値 ÷ 同一血清型ウイルス由来の固相化 DNA と識別用 DNA プローブとのハイブリダイゼーションの OD 値) × 100。

その結果を第 1 表に示す。なお、第 1 表中の空白欄は、いずれも結合 10 % 未満の値である。

【0021】

【表 2】

第1表
標準株の型鑑別 (結合率: %)

		血 凝 型										試 別 用 プ ロ ー プ																					
		A2	A3	A4	A5	A9	B1	B2	B3	B4	B5	B6	E3	E4	E5	E6	E9	E11	E14	E16	E18	E19	E24	E25	E27	E30	E71	PV1	PV2	PV3	RE3	RE7	
固 相	A2	100																															
	A3		100																														
	A4			100																													
	A5				100																												
	A9					100																											
							20																										
相 化	B1						100																										
	B2							100																									
	B3								100																								
	B4									100																							
	B5											100																					
	B6													100																			
D N A	E3												100																				
	E4													100																			
	E5														100																		
	E6																100																
	E9																	100															
	E11																		100														
	E14																			100													
	E16																				100												
	E18																						100										
	E19																								100								
	E24																									100							
	E25																										100						
	E27																											100					
	E30																												100				
E71																													100				
PV1																														100			
PV2																															100		
PV3																																100	
RE3																																100	
RE7																																100	

【0022】(J) 結果および考察

用いたピコルナウイルス標準株 (31株) の全てについて、PCR後のゲル電気泳動により、増幅された標的DNAバンドが検出された。またプレートハイブリダイゼーションを行った結果、第1表に示す結合パターンのおり各血清型由来の増幅DNA間に交差反応は認められなかった。この結合パターンからエンテロウイルスの検出および各血清型の識別が可能であることが判明した。

【0023】実施例2 エンテロウイルス分離株の検出及び血清型の識別

(A) 使用微生物

下記の、患者より分離され特異抗血清を用いた中和試験により血清型が同定されたエンテロウイルス分離株および実施例1の標準株を用いて実験を行った。

(1) エンテロウイルス分離株

【表3】

株名 (血清型)	分離時期
コクサッキーA群ウイルス4型 (A4)	
1155/72	1972年
1361/82	1982年
0269/84	1984年
0025/86	1986年
0023/87	1987年
0406/89	1989年
0313/91	1991年
エコーウイルス11型 (E11)	
1036/71	1971年
1183/77	1977年
1149/87	1987年
3137/81	1981年
1303/83	1983年
0798/84	1984年
0400/85	1985年
0107/90	1990年
エンテロウイルス71型 (E71)	
ナゴヤ/70	1970年
3059/78	1978年
3359/83	1983年
4132/85	1985年
236a/86	1986年
236c/86	1986年
0253/86	1986年
2587/89	1989年
4094/90	1990年

【0024】 (2) 標準株
【表4】

コクサッキーA群ウイルス	4型 (A4)
コクサッキーB群ウイルス	2 (B2)
〃	3 (B3)
〃	5 (B5)
エコーウイルス	9 (E9)
〃	11 (E11)
〃	30 (E30)
エンテロウイルス	71 (E71)
ポリオウイルス	3 (PV3)

【0025】 (B) 実験方法および結果
上記の各ウイルスから実施例1の (B) 項記載の方法に

よりRNAを抽出し、同 (C) 項記載の方法で各cDNAを合成した。更に同 (E) 項記載の方法で固相化DNA調製用遺伝子を増幅し、同 (F) 項記載の方法で血清型識別用DNAプローブ調製用遺伝子を増幅し、これらの増幅遺伝子DNAについて同 (G) 項記載のゲル電気泳動を行った結果、用いた全ての株に由来する増幅遺伝子DNAバンドが確認できた。これら増幅遺伝子DNAを同 (H) 項記載の方法で精製し、濃度測定を行った後に、同 (I) 項記載と同様にプレートハイブリダイゼーションさせ、各プローブの結合率 (%) を算出した。その結果を第2表～第4表に示す。なお、表中の空白欄は結合率が10%以下の値である。

【0026】
【表5】

第 2 表
 コクサッキーA群ウイルス4型（A4）分離株の型鑑別（結合率：％）

			血清型識別用 D N A プ ロ ー プ						
			1155/72	1361/82	0269/84	0025/86	0023/87	0406/89	0313/91
固 相 化 D N A	A 4 分 離 株	1155/72	100						
		1361/82	100						
		0269/84		100	63	50	50	58	
		0025/86		81	100	60	43	50	
		0023/87		50	44	100	36	33	
		0406/89		56	44	36	100	100	
		0313/91		56	44	29	79	100	
	標 準 株	A4							100
		B2							
		B3							
B5									
E9									
E11									
E30									
	E71								
	PV3								

【0027】

【表6】

【0028】

第3表
エコーウイルス11型(E11)分離株の型鑑別(結合率:%)

血清型識別用DNAプローブ											
1036/71 1183/77 1149/78 3137/81 1303/83 0798/84 0400/85 0107/90 標準株E11											
固相化DNA	1036/71	100		37	37		33	23			
	1183/77	100									
	1149/78		100	20	22		20				
	3137/81	43	23	100	111	103	117	92			
	1303/83	33	20	73	100	76	108	81			
	0798/84	20		93	100	100	104	81			
	0400/85	33	20	80	93	76	100	77			
	0107/90	23		67	78	62	79	100			
標準株A	A4										
	B2										
	B3										
	B5										
	E9										
	E11	100									
	E30										
	E71										
PV3											

【表7】

第4表
エンテロウイルス71型(E71)分離株の型鑑別(結合率:%)

		血清型識別用DNAプローブ											
		70/71	70/78	78/83	83/85	85/86a	86a/86c	86c/86	86/86	86/86	86/89	89/90	90/90
固相化DNA	70/71	100	110	100	84	98	90	89					
	70/78	75	100	64	105	75	62	63					
	78/83	82	85	100	100	82	83	85	22				
	83/85	79	95	73	100	71	69	63	26	38			
	85/86a	82	90	91	84	100	97	93					
	86a/86c	89	100	100	58	104	100	100					
	86c/86	82	90	95	84	104	93	100					
	86/89			32	37				100	119			
		4094/90			37				78	100			
標準株		A4	B2	B3	B5	E9	E11	E30	E71	PV3			100

【0029】第2表～第4表に示す結合パターンから明らかとなり、用いたエンテロウイルス分離株の全てのDNAプローブと各血清型の標準株由来の固相化DNAとの間に同一血清型間においても交差反応は認められなかった。一方、各血清型内の分離株については、およそ10年以内に分離された(同一血清型間の)流行ウイルス分離株で高い交差反応が認められた。以上の結果が

ら、血清型が既知の流行エンテロウイルス分離株(およそ10年以内に分離された株)の前記血清型に特異的な塩基配列を持つ遺伝子領域を増幅して、得られる血清型識別用DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行えば、容易に流行エンテロウイルスの検出および血清型の識別が可能であることが判明した。

フロントページの続き

- (72)発明者 石古 博昭
東京都板橋区志村 3-30-1 株式会社三
菱油化ビーシーエル内
- (72)発明者 柴 賢司
愛知県名古屋市中区辻町字流 7-6 愛知
県立衛生研究所内
- (72)発明者 石原 佑弼
愛知県名古屋市中区辻町字流 7-6 愛知
県立衛生研究所内

- (72)発明者 武田 直和
東京都新宿区戸山 1-23-1 国立予防衛
生研究所内
- (72)発明者 宮村 紀久子
東京都新宿区戸山 1-23-1 国立予防衛
生研究所内
- (72)発明者 井上 栄
東京都新宿区戸山 1-23-1 国立予防衛
生研究所内